ANALYSE ELECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES FONGIQUES DE DIFFÉRENTS *TUBER* EN ASSOCIATION OU NON AVEC *CORYLUS AVELLANA*

par Chantal DUPRÉ et Gérard CHEVALIER *

* Station d'Agronomie, Unité de Mycologie, I.N.R.A., 12 avenue du Brézet, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France.

RÉSUMÉ - La composition protéinique des mycéliums de différents *Tuber*, en culture pure ou en association avec *Corylus avellana* s'avère un critère hautement spécifique, utilisable en taxonomie. Cultures pures et mycorhizes sont riches en polypeptides mais le contenu protéinique du mycélium isolé est qualitativement supérieur à celui des mycorhizes. L'isolement d'un groupe de polypeptides spécifiques à *Tuber melanosporum* est la première étape de la mise au point d'une méthode d'identification rapide du matériel fongique et symbiotique par la voie immunologique.

ABSTRACT - Two different types of *Tuber* mycelia - i.e. free-living vs associated with *Corylus avellana* - have been studied for their protein composition, using SDS-PAGE electrophoresis. This protein diversity appeared to be a highly specific taxonomical criterion. The pure cultures as well as the mycorrhizae both displayed a large number of polypeptide bands. However the protein diversity of the isolated mycelium was richer. The characterization of a group of *T. melanosporum*-specific polypeptides will be the first step in designing a new rapid identification method, involving immunological techniques, to be used for fungal and mycorrhizal material.

MOTS CLÉS : ectomycorhizes, électrophorèse, *Corylus avellana, Tuber*, taxonomie.

INTRODUCTION

Les méthodes basées sur la morphologie classique (examen des corps fructifères, des mycéliums en culture ou des mycorhizes) ne permettent pas toujours d'identifier avec certitude toutes les espèces du genre *Tuber* (truffes) (Chevalier et al., 1985). Certaines espèces ont des corps fructifères qui présentent une forte similitude; il en est ainsi de *Tuber aestivum* Vitt. (Truffe d'été) et *T. uncinatum* Ch. (Truffe dite de Bourgogne), de *T. brumale* Vitt. et *T. hiemalbum* Ch., de *T. rufum* Pico ("Nez de chien") et de *T. ferrugineum* Vitt.

Les cultures mycéliennes des *Tuber* présentent également une telle analogie que l'identification de l'espèce en cause est difficile.

Enfin, les mycorhizes peuvent donner lieu à des phénomènes de convergence morphologique; ainsi, celles de *T. magnatum* Pico (Truffe blanche du Piémont), comestible de grande valeur, sont identiques à celles de *T. albidum* Pico ("Blanquette" des Italiens), comestible médiocre.

L'utilisation de méthodes d'identification autres que celles basées sur la morphologie classique s'avère donc nécessaire.

Dans un travail préliminaire, Mouchès et al. (1981), puis Dupré et al. (1984) ont montré qu'il existe des différences importantes entre les protéinogrammes des corps fructifères d'espèces différentes de *Tuber* et que ce caractère peut constituer un critère taxonomique, mais les problèmes de la variation intraspécifique et de la composition protéinique des mycéliums et des mycorhizes n'ont pas été abordés.

A la même époque, l'existence de protéines spécifiques d'un état symbiotique a été largement mise en évidence chez les associations du type Légumineuses-*Rhizobium* (Legocki & Verma, 1980; Strozycki et al., 1985).

L'apparition de polypeptides spécifiques de l'état infecté a également été observée dans le cas des relations plante-pathogène (Gianinazzi, 1985; Collinge & Slusarenko, 1987). Récemment, Hilbert & Martin (1988) ont utilisé l'électrophorèse bidimensionnelle pour caractériser les niveaux d'expression des polypeptides fongiques et racinaires.

La rareté des travaux sur la biosynthèse des protéines par le complexe champignon-racine nous a incités à tenter d'appliquer l'électrophorèse à la mise en évidence d'éventuels polypeptides spécifiques de la symbiose chez les *Tuber*. Nous avons donc comparé les profils polypeptidiques des protéines totales extraites, soit d'ectomycorhizes résultant de la symbiose entre le noisetier commun (*Corylus avellana* L.) et différentes truffes (*Tuber melanosporum* Vitt., Truffe dite de Périgord; *T. brumale* Vitt.; *T. uncinatum* Ch.; *T. magnatum* Pico), soit de racines non mycorhizées, soit de cultures mycéliennes de différents isolats de la même espèce ou d'espèces différentes de *Tuber*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les plantules de *Corylus avellana* issues de semis et mycorhizées avec des suspensions sporales suivant une technique maintenant classique (Chevalier et al., 1973) ont été élevées en serre, en pots ouverts, dans de la vermiculite arrosée avec une solution nutritive (Dupré et al., 1982). Les plants témoins (non inoculés) ont été élevés dans les mêmes conditions.

Quatre mois après l'inoculation qui a eu lieu en avril 1989, les mycorhizes sont bien développées. Elles sont prélevées individuellement sous la loupe binoculaire puis débarrassées des débris attenant à leur surface par passage environ 45 secondes dans une cuve à ultrasons. Elles sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 18 heures et rincées par 3 passages dans de

l'eau désionisée stérile. Le prélèvement et le nettoyage des radicelles non mycorhizées s'opèrent de la même façon.

L'extraction des protéines est effectuée à partir de 350 à 450 mg de matériel frais.

Matériel fongique

Les essais ont porté sur des isolats de cinq espèces de *Tuber: Tuber melanosporum, T. brumale, T. aestivum, T. uncinatum, T. albidum*, pour des comparaisons interspécifiques et sur cinq isolats issus de carpophores d'origine géographique différente (isolats 3, 10, mel 20) ou de mycorhizes (isolats 1015, 1017) de *T. melanosporum*, pour des comparaisons intraspécifiques.

Les cultures mycéliennes ont été réalisées en flacons stériles à usage unique de type "Corning" (Polylabo), à surface de culture de 75 cm^2, dans 30ml de milieu nutritif liquide (malt à 1%, pH: 5,6).

Les thalles âgés de 4 mois ont été débarrassés de la pastille gélosée d'inoculum, rincés 3 fois à l'eau bipermutée et essorés dans du papier filtre.

L'extraction des protéines a été réalisée à partir de 430 à 592 mg de mycélium frais.

Extraction des protéines

L'extraction des protéines a été effectuée selon la méthode décrite par Hilbert & Martin (1988).

Le dosage de la quantité de protéines a été réalisé à l'aide du réactif préconisé par Biorad, d'après la technique de Bradford (1976).

Les protéines sont solubilisées par reprise du culot protéique dans 40μl de tampon de Laemmli (1970): tris-HCl 0,0625 M pH 6,8; glycérol 10%; sodium dodécyl sulfate 2%; mercaptoéthanol 5%; bleu de bromophénol 0,01%. L'ensemble est chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Les extraits refroidis sont conservés au congélateur à -18°C.

Electrophorèse

L'électrophorèse monodimensionnelle sur gels de polyacrylamide est réalisée verticalement en plaque de 180 x 160 x 15 mm dans une cuve "Lagon" thermostatée; elle est dénaturante.

La composition des gels en acrylamide-bisacrylamide est celle décrite par Hilbert (1985); seule la concentration de Temed a été modifiée. La composition du gel de concentration des protéines (5%) est la suivante: acrylamide à 30% (p/v), 3,34ml; bisacrylamide à 1% (p/v), 5,20ml; tris-HCl 0,5M (pH 6,8), 5ml; SDS à 20% (p/v), 0,10ml; persulfate d'ammonium à 10% (p/v) 0,10ml; Temed, 0,017ml; eau ultrapure, 6,25ml; total, 20ml. Celle du gel de séparation des protéines (15%) est: acrylamide à 30%, 20ml; bisacrylamide à 1%, 3,47ml; tris-HCL 1,5M pH (8,8), 10,80ml; SDS à 20%, 0,20ml; persulfate d'ammonium à 10%, 0,20ml; temed, 0,020ml; eau ultrapure, 5,33ml; total, 40ml.

Après la polymérisation du gel de séparation, haut de 11,5cm, le gel de concentration est coulé sur une hauteur de 4,5cm et un peigne de 20 puits destinés à contenir les dépôts protéiques y est inséré. On dispose dans chaque puits 20μl de dépôt contenant respectivement pour les mycorhizes, les racines témoins et les thalles mycéliens: 8-11, 6-8 et 6-8μg de protéines.

La masse moléculaire des sous-unités protéiques est déterminée à l'aide de "Kit" de calibrage LWM (Pharmacia) contenant 6 marqueurs protéiques.

Le tampon de migration électrophorétique est celui de Laemmli (1970). L'électrophorèse s'effectue à voltage constant: 90 volts, durant le passage des polypeptides dans le gel de concentration et 70 volts durant le passage dans le gel de séparation. La température du gel est constante (14°C); la durée de l'électrophorèse est de 16 h. Ces conditions se sont avérées favorables à une bonne résolution des bandes (séparation, netteté, horizontalité).

La révélation des protéines est effectuée par coloration argentéique de Heukeshover & Dernicks (1985) simplifiée par Damerval et al. (1987).

RÉSULTATS

*** Comparaison entre les profils polypeptidiques de racines mycorhizées et ceux de racines témoins.**

A l'électrophorèse des protéines membranaires, les racines mycorhizées présentent de 23 à 28 bandes majeures (dont 16 communes à tous les profils), les racines témoins 20 bandes majeures (Fig. 1).

Les profils obtenus à partir des racines mycorhizées prélevées sur des noisetiers du même âge et élevés dans les mêmes conditions sont reproductibles, quelle que soit l'origine génétique des plantules.

Dix bandes majeures sont communes aux profils des mycorhizes et des racines non mycorhizées (Fig. 1, flèches).

*** Comparaison entre les profils polypeptidiques des cultures mycéliennes.**

Le nombre des polypeptides du mycélium en culture pure est élevé: 35 à 40 bandes majeures, selon l'espèce.

La comparaison des profils polypeptidiques de cinq isolats d'espèces différentes de *Tuber* montre que, comme dans le cas des corps fructifères, le spectre protéinique des mycéliums en culture pure peut constituer un critère de différenciation des espèces, utilisable en taxonomie; par ailleurs, la comparaison des profils de cinq isolats de *T. melanosporum* d'origine géographique différente (France et Italie) montre que les spectres protéiniques offrent une très grande similitude, puisqu'environ 80% des bandes principales sont communes. Il a été possible de sélectionner un groupe de polypeptides spécifiques à *T. melanosporum*; cette bande ms (*melanosporum* spécifique) a les caractéristiques suivantes: PM = 67 KD; Rf = 0,195 (Fig. 2). Son absence, dans le profil 4, qui correspond, comme le

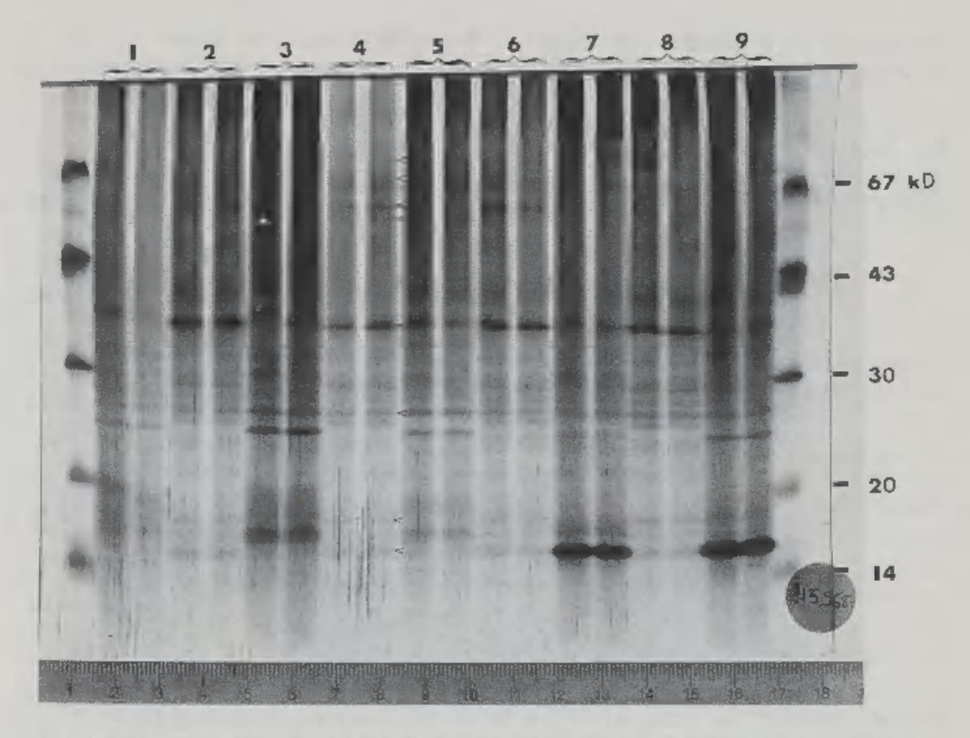


Fig. 1: Comparaison entre les profils polypeptidiques de racines de *Corylus avellana* mycorhizées par différents *Tuber* et ceux de racines témoins non mycorhizées (1 et 3: *T. brumale*; 5: *T. melanosporum*; 7: *T. uncinatum*; 9: *T. magnatum*; 2; 4, 6, 8: racines témoins). Les bandes communes sont signalées par une flèche.

Fig. 1: Comparison between polypeptides electrophoregrams from short roots of *Corylus avellana* mycorrhized by several *Tuber* and those of non-mycorrhizal short roots (1 and 3: *T. brumale*; 5: *T. melanosporum*; 7: *T. uncinatum*; 9: *T. magnatum*; 2, 4 , 6, 8: non-mycorrhizal short roots). The common bands are indicated with an arrow.

profil 5, à un extrait de l'isolat 1017, mais plus ancien, est attribuée à la mauvaise conservation des protéines.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le contenu protéinique des mycorhizes est plus riche que celui des racines témoins, mais la quantité de polypeptides dans les mycorhizes est moins importante que celle du mycélium en culture (23 à 28 groupes de protéines au lieu de 35 à 40); il y aurait donc répression de certaines protéines fongiques dans la mycorhize. Ce phénomène confirme les observations biochimiques de Martin et al. (1987) et les observations microscopiques de Dexheimer et al. (1986) qui démontrent que des modifications sont induites par l'établissement de la symbiose mycorhizienne.

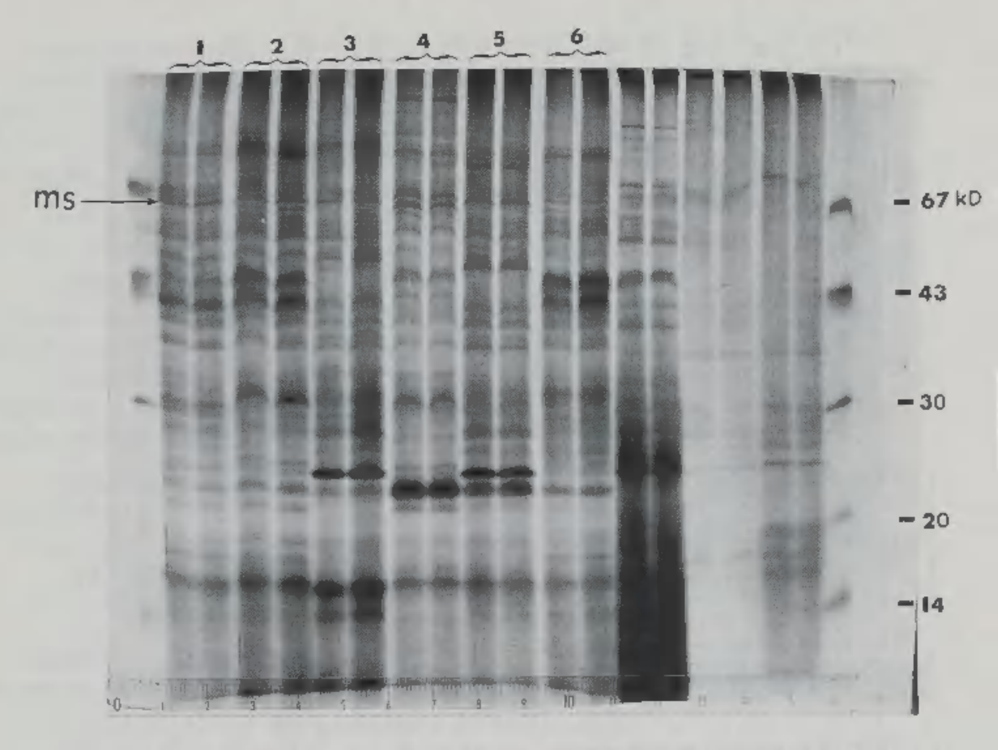


Fig. 2: Mise en évidence d'un groupe de polypeptides spécifiques ms (PM: 67 000; Rf: 0, 195) dans les mycéliums en culture pure de 5 isolats de *Tuber melanosporum* d'origine différente (1 = isolat 10, 2 = isolat 3, 6 = isolat mel 20, obtenus à partir d'ascocarpes; 3 = isolat 1015, 4 et 5 = isolat 1017, obtenus à partir de mycorhizes; 1, 2: ascocarpes provenant d'Italie; 3, 5, 6: ascocarpes ou mycorhizes d'origine française).

Fig. 2: Characterization of a group of ms specific polypeptides (PM: 67 000; Rf: 0, 195) in pure culture mycelia of 5 *T. melanosporum* strains obtained through different ways (1 = strain 10, 2 = strain 3, 6 = strain mel 20, isolated from ascospores; 3 = strain 1015, 4 and 5 = strain 1017, isolated from mycorrhizae; 1, 2: ascocarps originating from Italy; 3, 5, 6: ascocarps or mycorrhizae originating from France).

La technique utilisée ne permet pas cependant d'étudier de manière approfondie les modifications quantitatives et qualitatives de matériaux aussi riches en polypeptides. Parmi les solutions apportées afin de poursuivre ce travail, le fait d'avoir isolé un groupe de polypeptides spécifiques a incité à choisir la voie immunologique.

Un travail est en cours, en collaboration avec le Laboratoire de recherches sur les symbiotes racinaires de l'I.N.R.A. de Montpellier. L'objectif est de mettre au point une méthode immunologique d'identification rapide du champignon en culture ou en association avec la racine, lorsque les critères morphologiques traditionnels d'identification s'avèrent insuffisants.

Ce travail implique l'utilisation de mycorhizes obtenues par association entre un matériel fongique sélectionné isolé par bouturage de fragments d'ascocarpes et un matériel végétal homogène obtenu par clonage.

Une première application pourrait être la différenciation des mycorhizes de *T. magnatum* de celles de *T. albidum* et celle des mycorhizes de *T. aestivum* et *T. uncinatum*, espèces présentant toutes un intérêt économique certain mais de qualité gustative très inégale.

BIBLIOGRAPHIE

BRADFORD M.M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.

CHEVALIER G., GRENTE J. et POLLACSEK A., 1973 - Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Ann. Phytopathol.* 5: 107-108.

CHEVALIER G., RIOUSSET L. et DUPRE C., 1985 - Taxonomie des truffes européennes. *In:* V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi, *Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes.* Paris, I.N.R.A.: 631-635.

COLLINGE D.B. and SLUSARENKO A.J., 1987 - Plant gene expression in response to pathogens. *Pl. Molec. Biol.* 9: 349-410.

DAMERVAL C.,, LE GUILLOUX M., BLAISONNEAU J. and DE VIENNE D., 1987 - A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis* 8: 158-159.

DEXHEIMER J., AUBERT-DUFRESNE M.P., GERARD J., LE TACON F. et MOUSAIN D., 1986 - Etude de la localisation ultrastructurale des activités phosphatasiques acides dans deux types d'ectomycorhizes: *Pinus nigra nigricans / Hebeloma crustuliniforme* et *Pinus pinaster / Pisolithus tinctorius. Bull. Soc. Bot. France, Lettres bot.* 133: 343-352.

DUPRE C., CHEVALIER G., MORIZET J. et LEBLEVENEC L., 1982 - Influence de l'azote et du phosphore sur la mycorhization de *Quercus pubescens* par *Tuber melanosporum* en conditions contrôlées. *In:* S. & V. Gianinazzi, *Les Mycorhizes: biologie et utilisation.* Paris, I.N.R.A.: 147-153.

DUPRE C., CHEVALIER G. et BRANLARD G., 1985 - Caractérisation des *Tuber* par électrophorèse de leurs protéines. *In*: Compt. Rend. 1er Colloque Natl. sur les Technologies de purification des protéines (Paris, 1-3 octobre 1984). Paris, D.P.I.C. - I.N.P.L.: 465-467.

GIANINAZZI S., 1985 - Genetic and molecular aspects of resistance induced by infections or chemicals. *In:* T. Kosuge & E.W. Nester, *Plant-Microbe Interactions.* New-York, Macmillan Publ. Comp.: 312-342.

HEUKESHOVEN J. and DERNICK R., 1985 - Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mecanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-112.

HILBERT J.L., 1985 - Caractérisation par électrophorèse bidimensionnelle des protéines synthétisées durant la morphogénèse de l'Ascomycète *Sphaerostilbe repens.* D.E.A. Université Nancy I, 60 p.

HILBERT J.L. et MARTIN F., 1988 - Modification des profils polypeptidiques lors de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 221-232.

LAEMMLI U.K., 1970 - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.

LEGOCKI P. and VERMA D.P.S., 1980 - Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of *Rhizobium*-legume symbiosis. *Cell* 20: 153-163.

MARTIN F., RAMSTEDT M. and SODERHALL K., 1987 - Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie* 69: 569-581.

MOUCHES C., DUTHIL P., POITOU N., DELMAS J. et BOVE J.M., 1981 - Caractérisation des espèces truffières par analyse de leurs protéines en gels de polyacrylamide et application de ces techniques à la taxonomie des champignons. *Mushroom Sci.* XI: 819-831.

STOZYCKI P., KONIECZNY A. and LEGOCKI A.B., 1985 - Identification and synthesis *in vitro* of plant-specific proteins in yellow lupin root nodules. *Acta Biochim. Polon.* 32: 27-34.